

doi:10.13361/j.qdyxy.201703035

· 综述 ·

16S rRNA 基因 PCR 扩增在尿路感染诊断中的应用进展

李霞¹, 王艳¹, 唐一琳², 郝莎莎¹

(青岛大学附属医院, 山东 青岛 266003 1 肾内科; 2 感染管理部)

[摘要] 尿路感染是临床中较常见到的一种感染性疾病,其发病率在感染性疾病中居第 2 位;目前诊断尿路感染的金标准是清洁中段尿培养,其缺点是耗时长且影响因素多。16S rRNA 基因是一种分子标志物,通过对其可变序列的分析,可快速鉴定细菌的种类,16S rRNA 基因聚合酶链反应(PCR)扩增技术广泛应用于细菌性阴道病、脓毒血症及肠道菌群失调等疾病的致病微生物的诊断。本文就 16S rRNA 基因 PCR 扩增技术在尿路感染诊断中的可行性、先进性、实用性等方面进行综述。

[关键词] 16S rRNA 基因;泌尿道感染;诊断;聚合酶链反应;综述

[中图分类号] R695;R446 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-4488(2017)03-0366-03

尿路感染是指各种病原微生物在尿路中生长、繁殖引起的尿路感染性疾病,是全球范围内常见的高发病。在感染性疾病中,其发病率仅次于呼吸道疾病。国外人群尿路感染发病率为 2.0%~5.0%^[1]。国内普通人群尿路感染发病率约为 0.91%^[2]。目前,育龄期妇女、免疫力低下者、老年人和尿路畸形者为尿路感染的好发人群。由于生理特点及解剖位置等因素,女性成为尿路感染的易感人群,男女发病比例约为 1:10^[3]。

1 尿路感染分类

按照感染发生部位尿路感染可分为上尿路感染(多为肾盂肾炎)和下尿路感染(包括膀胱炎和尿道炎);根据有无尿路结构及功能的异常可分为单纯性尿路感染和复杂性尿路感染。其中,复杂性尿路感染是指伴有结构或功能异常,或者病人本身患有慢性肾实质性疾病,在此基础上又发生的尿路感染。复杂性尿路感染具有易感染、易复发等特点,由于多重耐药菌的存在,如产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌等,更使复杂性尿路感染的病程延长,病情复杂反复,可导致肾脏功能的损伤,甚至发展成尿毒症,对病人健康、生活质量及家庭经济等造成不利影响。

2 尿路感染诊断标准及检测方法

尿路感染者一般存在一定的尿路刺激征、感染中毒及腰部不适等症状,尿路感染一般结合病人尿液性状及细菌学检查结果进行诊断。尿常规是目前临床尿路感染常用的检测手段,检测迅速简便、价格便宜,但存在易污染、影响因素多等缺点。定量尿细菌培养是公认的诊断尿路感染的“金标准”,以下情况可诊断尿路感染:膀胱穿刺尿培养存在细菌生长。清洁中段尿行细菌定量培养 $\geq 10^8$ /L。如临床无症状,要求 2 次中段尿培养细菌数均 $\geq 10^8$ /L,且为同一菌种,亦可

诊断为尿路感染^[4]。必须指出,有明显膀胱刺激征的妇女,尿中有较多白细胞,如中段尿含菌数 $\geq 10^5$ /L 亦可拟诊为尿路感染,并等待细菌培养结果。如果尿培养检测细菌数在 $(10^7 \sim 10^8)$ /L 间,则应该复查;若再次尿培养的结果仍在 $(10^7 \sim 10^8)$ /L 间,确诊则需行膀胱穿刺尿培养或者结合病人的临床症状^[5]。

清洁中段尿培养也存在一定的不足,首先是培养耗时长,通常需要 2~3 d,不利于对尿路感染的快速诊断,且一定程度上延误了治疗;其次,影响因素较多,如尿液收集不标准,被污染;超过时间接种或技术错误等原因,可能导致一定的假阳性率。若近期使用过抗菌药或尿液膀胱贮存时间过短,甚至饮水过多等原因则会导致假阴性率。而且,尿培养不能检测到生长缓慢、在有氧环境中死亡的细菌。

综上所述,目前临床上还没有一种价格低廉、检测迅速、结果准确的诊断尿路感染检测方法。因此,寻找一种检测速度更快、灵敏度更高、实施更简便且结果更可靠的筛检方法,对于尿路感染的早期发现、早期治疗均有极其重要的意义。

3 人体微生态系统及研究方法

人体的微生态系统是由种类复杂数量繁多的微生物共同组成的,微生态系统中的正常菌群与人体处于一个共生状态,对促进人体生理功能的完善起极其重要的作用。微生态系统中的菌群与机体相互依存、相互协调、互为利益又相互制约^[6]。泌尿道微生态系统是人体内极为重要的生态系统之一,它在针对疾病防御机制方面起着重要的作用。菌群和宿主之间、菌群和菌群之间、菌群和尿道环境之间在尿道内始终保持着动态平衡,这种动态平衡对抵抗病原体入侵起着决定性的作用。一旦这种动态平衡失衡,就可能引起疾病的发生,比如当机体免疫力下降时由肠道细菌逆行感染即可引起尿路感染。

目前,非培养法常用于微生物生态学的研究,其中,16S rRNA 基因是一种分子标志物,通过对可变序列的分析,与数据库数据比较,可确定细菌间的种系发生学关系,并进

[收稿日期] 2016-11-03; **[修订日期]** 2017-04-10

[作者简介] 李霞(1991-),女,硕士研究生。

[通讯作者] 王艳(1964-),女,硕士,主任医师,硕士生导师。

行分类鉴定。因此,16S rRNA 基因聚合酶链反应(PCR)扩增技术广泛应用于细菌性阴道病、尿道炎、脓毒血症及肠道菌群失调等疾病的致病菌研究^[7-10]。当今,应用非培养法检测细菌性阴道病已成为研究热点,且 16S rRNA 基因 PCR 扩增技术是目前检测阴道微生物最常用的非培养检测技术。考虑到泌尿道与阴道相互邻近,且尿路病原菌大多来源于直肠,两者病原菌相似,阴道病原菌定植可增加复发性尿路感染的发生,因此,用该技术检测泌尿道致病微生物应该具有可行性。

目前,已有用 16S rRNA 基因检测法鉴定细菌培养阴性的成年女性膀胱病原体的研究^[11]。该研究表明,女性膀胱中明确存在细菌培养阴性的细菌,但其是否能繁殖和导致原发性尿路感染机制还不明确。PEARCE 等^[12]的研究显示,通过 16S rRNA 基因检测急迫性及非急迫性尿失禁女性尿道菌群组成,二者存在明显差异,这表明某些泌尿道微生物菌群在女性尿道健康方面扮演重要角色。另一研究表明,可以通过 16S rRNA 的高通量测序扩增子评估女性尿液菌群多样性,通过检测健康女性尿液,可提高导致疾病的致病菌的种类和种属的分辨率^[13]。谢良伊等^[14]应用 16S rRNA PCR 技术检测致病菌为淋球菌的泌尿生殖道感染,该技术检测淋球菌模板的下限为 6.41×10^{-7} g/L,显示其检测泌尿生殖道淋球菌感染具有简便、特异、快速的特点,可作为女性宫颈分泌物及尿液标本的检测手段。HAGIYA 等^[15]应用 16S rRNA 技术确诊 1 例致病菌为脑膜败血伊丽莎白金菌的肾造瘘相关的尿路感染。有研究表明,可以通过实时 PCR 技术从 HIV 阳性和阴性病人尿液中检测衣原体并确定其患病率^[16]。SIDDIQUI 等^[17]通过 16S rDNA 序列测定技术,研究间质性膀胱炎女性病人与无症状健康女性尿液的菌群差异,发现前者尿液菌群的多样性及丰度下降,而乳杆菌的丰度升高,研究表明高通量测序分析是更好地了解间质性膀胱炎微生物群的有效工具。

4 16S rRNA 基因序列

16S rRNA 基因是编码相对应的 rRNA 的 DNA 序列,不存在于病毒和真菌中,只存在于细菌的染色体基因组中,约由 1 540 个核苷酸组成,含有多个拷贝。16S rRNA 基因具有缓慢进化、高度保守等特点。因此,常用其作为细菌 PCR 扩增的目标序列。16S rRNA 基因序列另一优势是其总长度适宜,结构较其他序列完整,更有利于细菌分类的研究。判断是否存在细菌,可以通过设计保守区的引物 PCR 来检测,对共同引物 PCR 之间的扩增产物可变序列进行分析,将检测到的细菌序列数据与 16S rRNA 基因数据库中的数据进行比较,可确定各种细菌之间的种系发生学关系,并进行分类和鉴定。

16S rRNA 基因 PCR 扩增检测技术与其他感染性疾病诊断方法相比,具有更高的灵敏度和特异度,高度的特异性使其检测能力更强,高灵敏度使其检测时间更短^[18]。其次,该技术对微生物的分离培养为非培养技术方法,检测细菌

16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增产物,因此,不受应用抗生素的影响,能快速鉴定出死亡的细菌种类和目前人工无法培养的微生物,而且可以发现新的微生物种类,非常适于标本直接检测与快速鉴定^[19]。目前,该技术也存在一定的不足,通过检测细菌丰度来相对定量,并进一步通过定量来确定优势菌的构成比例,但对含量极低的菌种,检出是受限的^[20]。其次,该检测花费比尿常规及中段尿培养要高,且 PCR 的扩增过程中容易导致交叉扩增反应,从而出现假阳性结果^[21]。而且,采用 16S rRNA 基因测序法对微生物分离鉴定时,可能出现核酸污染等情况,出现假阳性,因此,要注意避免该情况的发生,在检测标本时要控制细菌的污染。

目前,主要采用非培养法检测微生物,而采用 PCR 扩增 16S rRNA 区间多态性已在多种疾病研究当中应用于细菌的快速检测与鉴定。随着对 16S rRNA 的基础理论和临床研究不断深入,实时 PCR 检测尿路感染病原菌作为补充诊断证实是可行的,其本身的优势,可以迅速鉴定尿路感染病人尿路中的微生物,通过对比确定致病菌。随着分子生物学理论和科学技术的迅速发展,从分子水平对尿路感染致病菌进行分类及鉴定将成为一种趋势,将来可能成为尿路感染极有价值的诊断方法。

[参考文献]

- [1] 王海燕. 肾脏病学[M]. 3 版.北京:人民卫生出版社,2008:801.
- [2] 全国泌尿系统疾病调查协作组. 18 万人群中泌尿系统疾病发病率的普查报告[J]. 中华医学杂志,1982,62(10):5770.
- [3] 王海燕. 肾脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:1246.
- [4] 叶任高. 尿路感染的诊断标准[J]. 新医学,1997,28(10):553-554.
- [5] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:499.
- [6] 黄惠琴,林茂,鲍时翔. 人体微生态系统简述[J]. 华南热带农业大学学报,2001,7(4):71-74.
- [7] 吕治,彭国丽,苏建荣,等. 细菌 16S rRNA 基因 PCR 诊断细菌性阴道病的研究[J]. 首都医科大学学报,2012,33(2):153-157.
- [8] YOSHIDA T, DEGUCHI T, ITO M, et al. Quantitative detection of mycoplasma genitalium from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002,40(4):1451-1455.
- [9] 吕其军,史太阳,周芳,等. 16S rRNA 基因检测在脓毒症早期诊断中的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(10):2395-2397.
- [10] 徐爱蕾,黄毅,王为. 16S rRNA 基因序列分析技术在肠道菌群检测中的应用进展[J]. 临床消化杂志,2015,27(3):186-189.
- [11] WOLFE A J, TOH E, SHIBATA N, et al. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012,50(4):1376-1383.
- [12] PEARCE M M, HIIT E E, Rosenfeld A B, et al. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without

urgency urinary incontinence[J]. *Mbio*, 2014,5(4):e01283.

- [13] SIDDIQUI H, NEDERBRAGT A J, LAGESEN K, et al. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16SrDNA amplicons[J]. *BMC Microbiology*, 2011,11(1):1-12.
- [14] 谢良伊,蔡瑞云. 16SrRNA-PCR在淋球菌引起的泌尿生殖道感染检测中的应用[J]. *实用预防医学*, 2010,17(3):571-573.
- [15] HAGIYA H, OGAWA H, TAKAHASHI Y, et al. A nephrostomy-associated urinary tract infection caused by *Elizabethkingia meningoseptica*[J]. *Internal Medicine*, 2015,54(24):3233-3236.
- [16] MAFOKWANE T M, SAMIE A. Prevalence of chlamydia among HIV positive and HIV negative patients in the vhembe district as detected by real time PCR from urine samples[J]. *BMC Research Notes*, 2016,9(1):1-10.

- [17] SIDDIQUI H, LAGESEN K, NEDERBRAGT A J, et al. Alterations of microbiota in urine from women with interstitial cystitis[J]. *BMC Microbiology*, 2012,12(1):1-11.
- [18] 闫志勇,王斌,苏维奇,等. 多重半套式 PCR 检测细菌 16s rRNA 基因方法的建立[J]. *青岛大学医学院学报*, 2001,37(1):22-24.
- [19] 马章林,唐曙明,楼许柏. 16SrRNA 在医学微生物鉴定中的应用探讨[J]. *吉林医学*, 2011,32(12):2291-2292.
- [20] 王克迪,吕治,苏建荣. 细菌性阴道病病人阴道菌群特征的非培养分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2011,18(6):402-407.
- [21] LEHMANN L E, HAUSER S, MALINKA T, et al. Real-time polymerase chain-reaction detection of pathogens is feasible to supplement the diagnostic sequence for urinary tract infections[J]. *British Journal of Urology International*, 2010,106(1):114-120. (本文编辑 厉建强)

(上接第 365 页)甚至认为,SLE 与溃疡性结肠炎共存纯属偶然事件^[11]。

SLE 并发结直肠溃疡与炎症性肠病均可出现腹痛、腹泻、黏液脓血便等临床表现。溃疡性结肠炎镜下可表现为肠黏膜弥漫性充血水肿,多发浅溃疡形成,病变呈连续性及弥漫性分布;病理检查可见中性粒细胞浸润、隐窝脓肿等。克罗恩病镜下多表现为回肠末端纵形裂隙状溃疡,铺路石样外观,溃疡之间黏膜正常;病理检查可见非干酪样肉芽肿。SLE 并发结直肠溃疡镜下及病理表现并不特异,因此鉴别较为困难。我国近期报道的 1 例 SLE 并发克罗恩病的诊断是依据术中病理检查确定的^[12]。

2.4 治疗

SLE 并发结直肠溃疡非常危险,随时可能出现溃疡穿孔甚至危及病人生命,因此早期诊断早期治疗能够显著改善预后,避免不必要的手术,提高生活质量。目前,SLE 并发结直肠溃疡尚无统一治疗方案。大部分病人对糖皮质激素反应良好^[2,4,13],联合应用免疫抑制剂,如环磷酰胺、麦考酚酯等也可获得较好疗效^[3,4,14]。此外,让胃肠道充分休息,肠外营养及维持水、电解质平衡也很重要。

【参考文献】

- [1] SULTAN S M, IOANNOU Y, ISENBERG D A. A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 1999,38(10):917-932.
- [1] MEDINA F, AYALA A, JARA L J, et al. Acute abdomen in systemic lupus erythematosus: the importance of early laparotomy[J]. *Am J Med*, 1997,103(2):100-105.
- [3] LIN H P, WANG Y M, HUO A P. Severe, recurrent lupus enteritis as the initial and only presentation of systemic lupus erythematosus in a middle-aged woman[J]. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 2011,44(2):152-155.
- [4] MIYAHARA S, ITO S, SOEDA A, et al. Two cases of systemic lupus erythematosus complicated with colonic ulcers[J]. *Intern Med*, 2005,44(12):1298-1306.

- [5] TERAMOTO J, TAKAHASHI Y, KATSUKI S, et al. Systemic lupus erythematosus with a giant rectal ulcer and perforation[J]. *Intern Med*, 1999,38(8):643-649.
- [6] AMIT G, STALNIKOWICZ R, OSTROVSKY Y, et al. Rectal ulcers: a rare gastrointestinal manifestation of systemic lupus erythematosus[J]. *J Clin Gastroenterol*, 1999,29(2):200-202.
- [7] 袁诗雯,李昊,陈冬莹,等. 狼疮肠炎发病的相关因素分析[J]. *中华医学杂志*, 2013,93(15):1162-1164.
- [8] BYUN J Y, HA H K, YU S Y, et al. CT features of systemic lupus erythematosus in patients with acute abdominal pain: emphasis on ischemic bowel disease[J]. *Radiology*, 1999,211(1):203-209.
- [9] NEVITT A W, VIDA F, KOZAREK R A, et al. Expandable metallic prostheses for malignant obstructions of gastric outlet and proximal small bowel[J]. *Gastrointest Endosc*, 1998,47(3):271-276.
- [10] YUASA S, SUWA A, HIRAKATA M, et al. A case of systemic lupus erythematosus presenting with rectal ulcers as the initial clinical manifestation of disease[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2002,20(3):407-410.
- [11] KOUTROUBAKIS I E, KRITIKOS H, MOUZAS I A, et al. Association between ulcerative colitis and systemic lupus erythematosus: report of two cases[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1998,10(5):437-439.
- [12] 朱建国. 系统性红斑狼疮并发炎症性肠病的回顾性研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2010,14(24):70-71.
- [13] CABRERA G E, SCOPELITIS E, CUELLAR M L, et al. Pneumatosis cystoides intestinalis in systemic lupus erythematosus with intestinal vasculitis: treatment with high dose prednisone[J]. *Clin Rheumatol*, 1994,13(2):312-316.
- [14] GRIMBACHER B, HUBER M, VON KEMPIS J, et al. Successful treatment of gastrointestinal vasculitis due to systemic lupus erythematosus with intravenous pulse cyclophosphamide: a clinical case report and review of the literature[J]. *Br J Rheumatol*, 1998,37(9):1023-1028. (本文编辑 马伟平)